

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

на правах рукописи

Комеч Екатерина Александровна
**Сравнительный анализ репертуаров Т-клеточных рецепторов у пациентов с
аутоиммунными заболеваниями**

специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории сравнительной и функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Лебедев Юрий Борисович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией сравнительной и функциональной геномики ИБХ РАН

Официальные оппоненты:

Атауллаханов Равшан Иноятович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий Лабораторией активации иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения Государственного научного центра Института иммунологии

Ефимов Григорий Александрович, кандидат биологических наук, заведующий Лабораторией трансплантационной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения Национального медицинского исследовательского центра гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

Защита диссертации состоится «30» октября 2019 года в : на заседании диссертационного совета Д002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте www.ibch.ru.

Автореферат разослан « » _____ 2019 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук
В.А. Олейников



Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Аутоиммунные заболевания (АЗ) являются одной из сложных проблем современной иммунологии и медицины и составляют до 2% от заболеваний человека в мире. Накопленные к настоящему моменту сведения говорят о важной роли Т-клеточного звена адаптивной иммунной системы в патогенезе АЗ. Развитие технологии широкомасштабного секвенирования (HTS, от англ. high-throughput sequencing) позволило реконструировать клональные репертуары Т-лимфоцитов, что открывает возможности для выявления клонов Т-клеток, ассоциированных с развитием конкретных аутоиммунных заболеваний.

Спондилоартропатии (СпА) – хронические и постепенно прогрессирующие заболевания суставов аутоиммунной природы. Молекулярные механизмы инициации и патогенеза СпА остаются невыясненными. Специфической терапии для СпА не существует, а применяемые лекарственные препараты направлены на общее подавление воспалительного процесса. Исследования, направленные на изучение молекулярных механизмов патогенеза СпА, необходимы для разработки новых способов и стратегий терапии.

Одним из потенциальных подходов к терапии прогрессирующих СпА может стать аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток крови (ТГСК), которая заключается в подавлении иммунной системы при помощи химиотерапии и последующем введении заранее заготовленных стволовых клеток крови пациента, что приводит к "перезагрузке" иммунной системы.

Степень ее разработанности

Вся группа спондилоартропатий, и в особенности анкилозирующий спондилит (АС, или болезнь Бехтерева), ассоциирована с аллельным вариантом гена главного комплекса гистосовместимости HLA-B*27. Согласно одной из теорий инициация СпА происходит при презентации молекулой HLA-B*27 "артритогенного" пептида CD8+ Т-клеткам, запускающим аутоиммунный ответ. Однако, "артритогенный" пептид, как и аутореактивные клоны Т-лимфоцитов, до сих пор не обнаружены. В то же время, все исследования клональных репертуаров Т-лимфоцитов пациентов с СпА выполнены до развития HTS, и следовательно, ограничены анализом нескольких десятков клонов Т-клеток.

В последние два десятилетия аутологичная ТГСК успешно применяется для лечения пациентов с тяжелым течением различных аутоиммунных заболеваний. Тем не менее, существует всего одна работа, описывающая долгосрочный терапевтический эффект ТГСК у одного пациента с анкилозирующим спондилитом.

Цели и задачи

Целью данной работы являлось выявление особенностей репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) пациентов со спондилоартропатиями и анализ динамики репертуара в ходе терапевтической трансплантации гемопоэтических стволовых клеток крови с использованием широкомасштабного секвенирования.

Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи:

- Анализ клональных репертуаров периферической крови пациентов с анкилозирующим спондилитом и здоровых доноров;
- Характеристика клональных репертуаров Т-лимфоцитов сайтов воспаления пациентов со спондилоартропатиями;
- Идентификация TCR, ассоциированных с развитием спондилоартропатий;
- Исследование динамики клонального репертуара Т-лимфоцитов пациентов с анкилозирующим спондилитом при терапевтической ТГСК.

Научная новизна

В данной работе с использованием оригинальной системы пробоподготовки кДНК библиотек бета-цепей TCR (TCRbeta) и HTS впервые на глубоком уровне охарактеризованы клональные репертуары Т-лимфоцитов периферической крови (ПК) и синовиальной жидкости (СЖ) воспаленного коленного сустава пациентов со спондилоартропатиями.

Продемонстрировано отсутствие выраженных различий в общей структуре репертуаров Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с АС и здоровых HLA-B*27+ и HLA-B*27- доноров. Вместе с тем, в индивидуальных репертуарах пациентов выделена общая группа высокомолекулярных клонотипов TCRbeta, ассоциированных с АС. Показана относительно низкая численность Т-клеток таких клонов в полном репертуаре Т-лимфоцитов периферической крови пациентов и их обогащение в репертуаре Т-клеток очага воспаления. Продемонстрировано, что АС-ассоциированные клонотипы также присутствуют у HLA-B*27+ пациентов с псориатическим артритом. Для одного из АС-ассоциированных клонотипов восстановлена полная структура TCR.

Впервые проведен долговременный анализ динамики клональных репертуаров Т-клеток периферической крови в ходе терапевтической аутологичной ТГСК у пациентов с АС. Продемонстрировано, что при аутологичной ТГСК без обогащения по стволовым CD34+ клеткам происходит лишь частичное обновление высокопредставленных клонотипов Т-клеток, а до 25% клонов происходит из репертуара до ТГСК.

Теоретическая и практическая значимость работы

Изучение клональных репертуаров Т-лимфоцитов периферической крови и сайтов воспаления у пациентов с СпА расширяет существующие знания о

функционировании адаптивной иммунной системы и ее компонентов при СПА. Выявление предположительно патогенных клонотипов Т-клеток подтверждает роль Т-лимфоцитов в инициации и/или патогенезе заболеваний данной группы. Идентифицированные клонотипы Т-клеток могут быть использованы в качестве маркеров для диагностики HLA-B*27-ассоциированных СПА, а также в качестве мишеней для направленной терапии.

Результаты данной работы могут быть использованы для оптимизации и разработки новых эффективных протоколов аутологичной ТГСК, применяемой для терапии тяжелых форм АС.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты диссертации были представлены на 9-ти международных конференциях: 5th European Congress of Immunology, 2018, Amsterdam, The Netherlands; 43rd FEBS Congress, Biochemistry Forever, 2018, Prague, Czech Republic; Cell-Weizmann Institute of Science Symposium: Next Generation Immunology, 2018, Rehovot, Israel; I, II и III междисциплинарных конференциях "Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания", 2016, 2017 и 2018 соответственно, Москва, Россия; 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference, 2016, Strbske Pleso, Slovakia; 4th European Congress of Immunology, 2015, Vienna, Austria; международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, 2014, Москва, Россия.

По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Минобрнауки России для публикации результатов диссертаций и входящих в базы данных Web of Science и Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 110 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, целей и задач, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка использованной литературы, включающего 222 ссылки, списка сокращений и приложения. Диссертационная работа содержит 24 рисунка и 8 таблиц.

Основное содержание работы

Стратегия реконструкции клональных репертуаров Т-лимфоцитов

Для реконструкции клональных репертуаров Т-лимфоцитов применялась оригинальная технология пробоподготовки кДНК библиотек TCR, которая позволяет избежать контаминации между образцами, а также искажений численности клонов и клонального разнообразия образца.

При синтезе первых цепей кДНК TCR использовали олигонуклеотиды, комплементарные С-сегментам альфа- и бета-цепей TCR (рис. 1). При этом с

использованием эффекта смены матрицы на 5' концы молекул кДНК TCR вводили универсальную адаптерную последовательность, что позволяло в дальнейшем амплифицировать кДНК библиотеки с использованием одной пары праймеров. Вводимый адаптер содержал первый индекс образца (Индекс 1 на рис. 1) и уникальный молекулярный баркод (UMI). Введение первого индекса образца на этапе синтеза кДНК позволяет детектировать контаминации между образцами, возникшие в ходе дальнейших этапов пробоподготовки. UMI, уникальный молекулярный баркод, представляет собой вырожденную последовательность из 12-14 нуклеотидов. Введение UMI в каждую молекулу кДНК позволяет при биоинформатической обработке результатов секвенирования устранить ошибки, возникшие в ходе ПЦР и секвенирования. Более того, так как UMI маркирует каждую молекулу мРНК TCR, вошедшую в анализ, становится возможным оценить численность каждого клона без искажений, возникших из-за неравномерности ПЦР-амплификации.

После синтеза кДНК проводили два этапа ПЦР-амплификации. На втором этапе ПЦР в кДНК библиотеку каждого образца был введен второй индекс образца (Индекс 2 на рис. 1). Введение двух образец-специфических индексов позволяет надежно определять последовательности, соответствующие конкретному образцу. Полученные библиотеки кДНК TCR секвенировали с использованием специальных праймеров чтения на платформе Illumina по 100-150 нт с обоих концов.

Для восстановления индивидуальных репертуаров Т-лимфоцитов из "сырых" данных секвенирования был применен алгоритм, состоящий из нескольких этапов

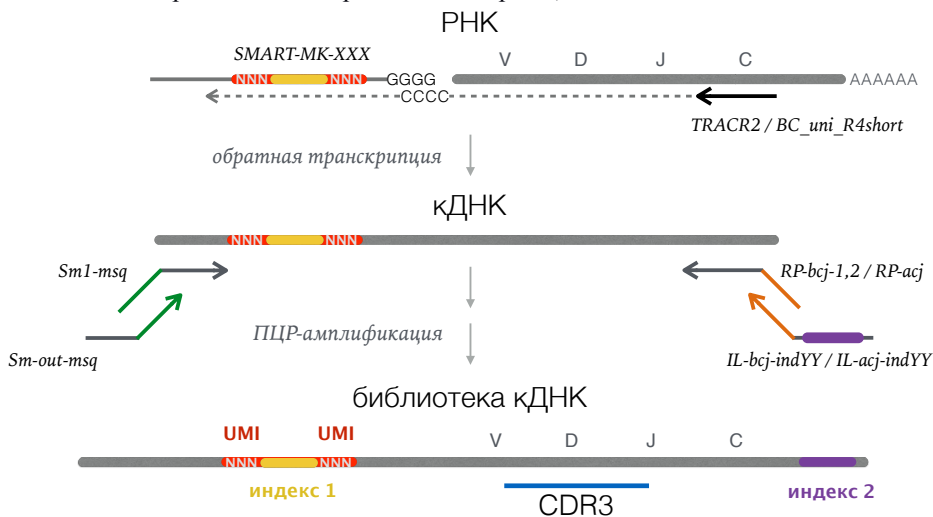


Рисунок 1 Схема пробоподготовки кДНК библиотек антиген-распознающих доменов (CDR3) бета-цепей TCR. Пояснения в тексте.

биоинформатической обработки. В начале общий массив последовательностей разделяли на образцы по соответствию двух образец-специфических индексов. Затем проводили корректирование ошибок ПЦР-амплификации и секвенирования за счет анализа UMI с помощью программного обеспечения MiGEC. Для дальнейшего анализа отбирали последовательности, прочитанные минимум дважды по результатам анализа UMI, таким образом исключая большинство ошибочных последовательностей.

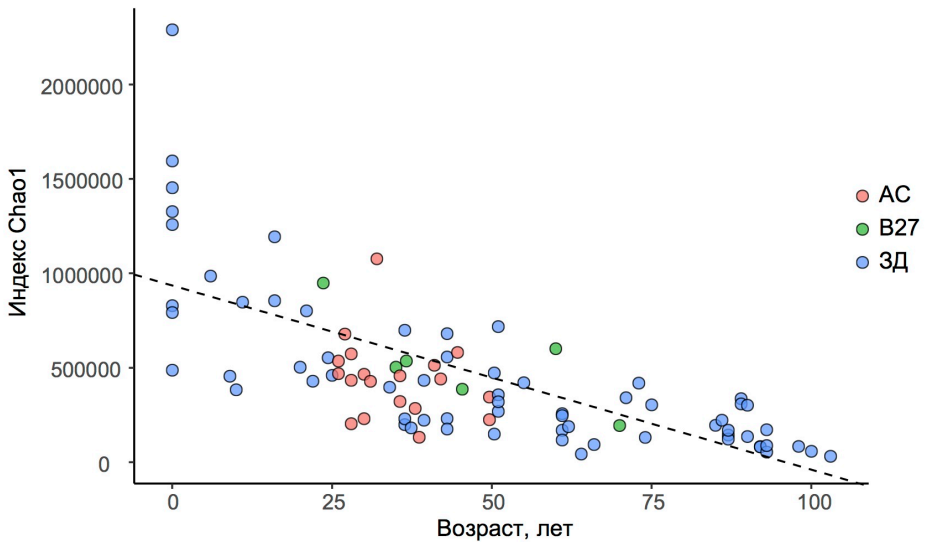
Далее с помощью программного обеспечения MiXCR проводили экстракцию последовательностей, содержащих антиген-распознающий домен TCR (CDR3), определяли V-, D- и J-сегменты TCR и формировали список клонотипов каждого образца.

С использованием вышеописанной технологии были реконструированы 7 клональных репертуаров альфа- и 208 репертуаров бета-цепей TCR образцов периферической крови и синовиальной жидкости пациентов с анкилозирующим спондилитом (n=31) и псориатическим артритом (ПсА, n=12), а также образцов периферической крови HLA-B*27+ здоровых доноров (n=8).

Анализ репертуаров периферической крови пациентов с АС

Одной из основных характеристик клонального репертуара Т-клеток является его разнообразие, то есть количество различных клонов в образце. В норме клональное разнообразие уменьшается с возрастом, что связано с инволюцией тимуса и прекращением образования новых клонов наивных Т-клеток. Однако хроническое воспаление при онкологических и аутоиммунных заболеваниях может приводить к преждевременному "старению" иммунной системы: постоянно присутствующие в организме антигены поддерживают экспансию специфичных к ним клонов Т-клеток, таким образом не оставляя места в репертуаре для других клонов. Чтобы проверить наличие высокопредставленных клонов, характерных для пациентов с АС, мы исследовали клональное разнообразие, частоты использования V-сегментов TCR и количество общих клонотипов.

Для анализа клонального разнообразия использовали индекс Chao1, который учитывает богатство образца низкочисленными клонами наивных Т-клеток. Для сравнения были использованы репертуары здоровых HLA-B*27+ доноров, а также ранее опубликованные репертуары здоровых HLA-B*27- доноров. Учитывая чувствительность выбранной метрики к глубине анализа, мы случайным образом отобрали по 50000 UMI из каждого образца, что, по ранее проведенной оценке, приблизительно соответствует 50000 Т-клеткам. Клональное разнообразие репертуаров пациентов с АС значимо не отличалось от разнообразия репертуаров здоровых HLA-B*27+ и HLA-B*27- доноров соответствующего возраста (p>0.05, U-критерий Манна-Уитни, рис. 2).



*Рисунок 2 Клональное разнообразие репертуаров Т-лимфоцитов периферической крови, выраженное индексом Chao1, пациентов с анкилозирующим спондилитом (n=25, AC), HLA-B*27+ здоровых доноров (n=6, B27) и HLA-B*27- здоровых доноров (n=101, ЗД). Репертуары HLA-B*27- доноров взяты из ранее опубликованных исследований. Возраст 0 соответствует репертуарам Т-клеток из образцов пуповинной крови.*

Иммунный ответ против одного антигена может обеспечиваться клонами Т-лимфоцитов со схожей структурой TCR. Предполагая, что репертуары пациентов с AC будут обогащены группой таких клонотипов, мы изучили частоты V-сегментов TCR. Однако при сравнении частот V-сегментов не было выявлено ярковыраженных отличий репертуаров Т-клеток пациентов с AC от здоровых HLA*B27+ или HLA-B*27- доноров ни среди общей фракции Т-лимфоцитов, ни среди CD4+ или CD8+ субпопуляций.

Не обнаружив обогащения репертуаров пациентов клонотипами с одинаковыми V-сегментами, мы провели более детальный анализ на уровне отдельных клонотипов. Мы ожидали, что количество общих клонотипов между любыми двумя пациентами с AC будет выше, чем между любыми двумя здоровыми донорами. Так как наиболее высокочисленные клонотипы обогащены клонами, прошедшими антиген-зависимую клональную экспансию, то мы сфокусировались на сравнении 10000 наиболее высокопредставленных клонотипах из репертуара каждого образца. Однако количество общих клонотипов между репертуарами пациентов с AC значимо не отличалось от количества общих клонотипов между репертуарами здоровых HLA*B27+ или HLA-B*27- доноров.

Резюмируя, ярковыраженных различий в общей структуре репертуара Т-лимфоцитов (клональной разнообразии, частотах использования V-сегментов и количестве общих клонотипов) у пациентов с АС в сравнении со здоровыми донорами соответствующего возраста обнаружено не было. Возможным объяснением данного факта может быть таргетирование патогенных клонов Т-лимфоцитов непосредственно в очаги воспаления и, как результат, их малая численность в периферической крови пациентов.

Поиск АС-ассоциированных клонотипов Т-лимфоцитов с помощью оценки вероятности генерации TCR

Не обнаружив высокопредставленных клонотипов, характерных для пациентов с АС, мы провели анализ всех клонотипов, присутствующих в репертуарах нескольких пациентов. Однако стоит учитывать, что присутствие клона Т-клеток в образцах различных доноров зависит от нескольких последовательных событий: во-первых, от вероятности генерации или "сборки" TCR данного клона в ходе VDJ-рекомбинации, во-вторых, от прохождения этим клоном тимусной селекции и, в-третьих, от клональной экспансии, которая за счет увеличения численности клеток клона повышает его шансы на попадание в отбираемый образец крови.

Ранее было продемонстрировано, что клоны Т-клеток с высокой вероятностью генерации присутствуют у большего числа доноров, чем клоны с низкой вероятностью генерации. В то же время, присутствие общего антигена в нескольких донорах приводит к экспансии специфичных к нему клонов вне зависимости от их вероятностей "сборки". Следовательно, анализируя присутствие клонотипов в репертуарах доноров и оценив их вероятности "сборки", появляется возможность выделить клонотипы с низкой вероятностью "сборки", детектируемые в аномально большом числе доноров вследствие произошедшей клональной экспансии.

На первом этапе для приблизительной оценки встречаемости клонотипов мы отобрали клонотипы, которые присутствуют по крайней мере у любых 3 пациентов с АС, и проанализировали их наличие в репертуарах здоровых доноров ($n=111$), взятых из ранее опубликованных работ. Только клонотип TRBV9_CASSVGLYSTDYQYF_TRBJ2-3 присутствовал в значимо большем количестве пациентов с АС по сравнению с контрольной группой ($p=3.34 \cdot 10^{-7}$, $FDR = 1.81 \cdot 10^{-2}$, точный тест Фишера).

Затем, чтобы выявить и другие клонотипы, которые чаще встречаются в репертуарах пациентов с АС по сравнению со здоровыми донорами, а также подтвердить факт клональной экспансии клонотипа TRBV9_CASSVGLYSTDYQYF_TRBJ2-3, мы отобрали все клонотипы с комбинацией сегментов TRBV9/TRBJ2-3, которые присутствуют как минимум у любых трех индивидов из выборки пациентов с АС и здоровых доноров. Для каждого отображенного клонотипа мы оценили вероятности "сборки" аминокислотной

последовательности CDR3 TCR. Для этого мы расширили ранее опубликованную математическую модель генерации TCR, применив к ней метод Монте-Карло: вероятность сборки аминокислотной последовательности CDR3 оценивали как число соответствующих ей нуклеотидных последовательностей, сгенерированных *in silico*.

В итоге, мы идентифицировали 8 клонотипов, которые присутствовали у значимо большего количества доноров, чем это можно было ожидать, исходя из их вероятности "сборки" (рис. 3А). Семь из них обладали высокомолекулярными аминокислотными последовательностями CDR3 TCR и присутствовали исключительно у пациентов с АС (рис. 3Б).

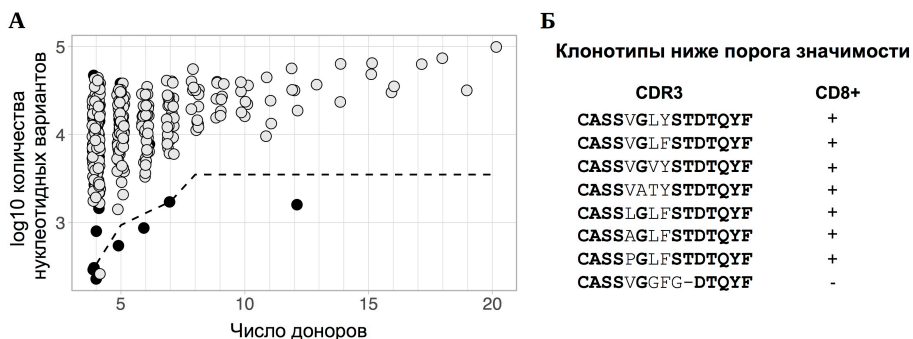


Рисунок 3. Идентификация АС-ассоциированных клонотипов с помощью оценки вероятностей генерации TCR. Каждый кружок представляет собой уникальный клонотип TCRβ с комбинацией сегментов TRBV9/TRBJ2-3. Черным отображены клонотипы, присутствующие только у пациентов с АС. Пунктирная линия отражает порог значимости $p=0.01$. Клонотипы под линией присутствуют в большем количестве доноров, чем можно было ожидать согласно их вероятности "сборки". Их аминокислотные последовательности и фенотип приведены справа.

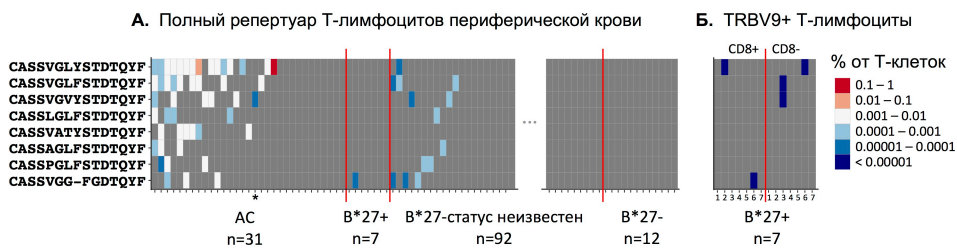
Ранее выявленный клонотип TRBV9_CASSVGLYSTDTQYF_TRBJ2-3 присутствовал у большинства пациентов ($n=15$). В сумме 20 из 31 пациентов с АС (65%) обладали хотя бы одним из восьми клонотипов. В соответствии с низкой вероятностью "сборки" каждый из восьми клонотипов был обнаружен не более чем в четырех донорах из контрольной выборки 111 здоровых доноров.

Для определения фенотипа выявленных клонотипов бета-цепей TCR мы проанализировали репертуары CD4+ и CD8+ Т-клеток периферической крови 8 пациентов с АС. Семь из 8 клонотипов были обнаружены исключительно во фракциях CD8+ Т-клеток, и только CASSVGGFGDTQYF был обнаружен в одном образце CD4+ Т-клеток (рис. 3Б).

Несмотря на повышенную встречаемость выявленных клонотипов в выборке пациентов, их относительная представленность в репертуарах периферической

крови оказалась достаточно низкой: в среднем менее 0.01% от всех Т-клеток образца (рис. 4А).

Чтобы исследовать присутствие АС-ассоциированных клонотипов у здоровых HLA-B*27+ доноров мы с помощью флуоресцентно-активируемого клеточного сортирования выделили не менее 35000 клеток субпопуляции CD3+CD8+TRBV9+ из образцов периферической крови доноров (n=7). Таким образом мы увеличили глубину анализа клонотипов с комбинацией сегментов TRBV9/TRBV2-3 по сравнению с репертуаром всех Т-лимфоцитов примерно в 6 раз. Суммарно мы обнаружили 4 АС-ассоциированных клонотипа в образцах 3 HLA-B*27+ здоровых доноров. Численность АС-ассоциированных клонотипов в репертуарах здоровых HLA-B*27+ доноров оказалась на несколько порядков меньше, чем у пациентов с АС, что свидетельствует о произошедшей клональной экспансии данных клонотипов в организме больных (рис. 4Б).



*Рисунок 4. Присутствие и численность АС-ассоциированных клонотипов в периферической крови (А) пациентов с анкилозирующим спондилитом (АС, n=31), HLA-B*27+ (n=7) и HLA-B*27- (n=12) здоровых доноров, а также доноров с неизвестным генотипом по HLA-B*27 (n=92). * - HLA-B*27- пациент с АС. (Б) Присутствие и численность клонотипов в репертуаре CD8+TRBV9+ и CD8-TRBV9+ субпопуляций Т-клеток здоровых HLA-B*27+ доноров (n=7); численность клонотипов приведена в соответствии с полным репертуаром.*

Для уточнения роли идентифицированных клонотипов в воспалительном процессе, мы исследовали клональный состав фракции Т-клеток периферической крови, экспрессирующих маркеры активации CD38 и HLA-DR, у одного из пациентов с АС на фоне обострения заболевания. В репертуаре выделенной фракции мы обнаружили АС-ассоциированный клонотип TRBV9_CASSVGVYSTDTQYF_TRBJ2-3. Через 2 месяца, в течение которых состояние пациента не изменилось, мы снова детектировали вышеописанный клонотип в репертуаре CD38+HLA-DR+ Т-клеток. Таким образом, нам удалось продемонстрировать длительное присутствие клеток одного из АС-ассоциированных клонотипов в активированном состоянии при обострении заболевания.

Анализ клональных репертуаров синовиальной жидкости пациентов со спондилоартропатиями

В предыдущей части мы идентифицировали клонотипы, предположительно ассоциированные с АС, однако присутствуют ли они в очагах воспаления оставалось неизвестным. Чтобы это выяснить, мы исследовали клональные репертуары синовиальной жидкости (СЖ) воспаленного коленного сустава, взятой в момент обострения заболевания у пациентов с АС (n=8) и псориатическим артритом (ПсА, n=12) – еще одним заболеванием из группы спондилоартропатий.

Сначала было необходимо установить, отличается ли клональный репертуар Т-лимфоцитов очага воспаления от репертуара периферической крови. С этой целью мы провели сравнительный анализ общих характеристик репертуаров: клонального разнообразия и частот V-сегментов TCR.

Клональное разнообразие Т-клеток СЖ было значимо ниже, чем разнообразие Т-клеток ПК тех же пациентов как в образцах всех Т-лимфоцитов, так и в образцах CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляций (p<0.01 U-критерий Манна-Уитни, рис.5А). Уровень олигоклональности (т.е. неравномерность представленности клонотипов в репертуаре) в репертуарах СЖ был значимо выше, чем в ПК (p<0.0001, U-критерий Манна-Уитни, рис. 5Б). Данный результат указывает на прохождение клональной экспансии существенной частью клонов очага воспаления.

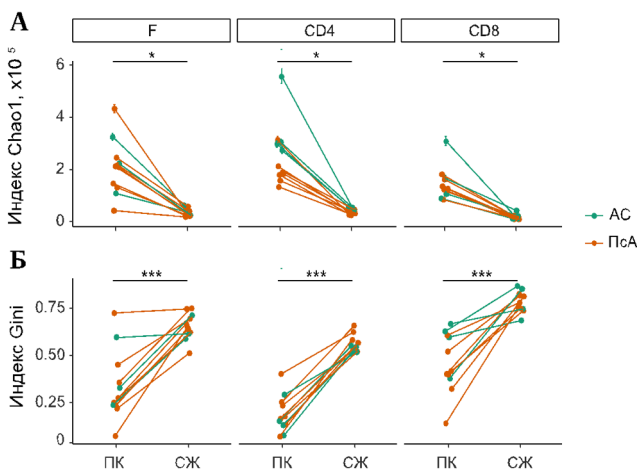


Рисунок 5. (А) Клональное разнообразие, выраженное индексом Chao1, и (Б) олигоклональность, выраженная индексом Gini, репертуаров всех Т-клеток и репертуаров CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляций Т-клеток из парных образцов периферической крови (ПК) и синовиальной жидкости (СЖ) пациентов с анкилозирующим спондилитом (АС) и псориатическим артритом (ПсА). Для каждого значения клонального разнообразия обозначен 95% доверительный интервал. * p<0.01, *** p<0.0001

Далее, чтобы подтвердить наличие экспансий в репертуаре Т-лимфоцитов СЖ, которые отличали бы его от репертуара ПК, мы исследовали частоты V-сегментов TCR. В анализ были взяты репертуары образцов ПК и СЖ всех пациентов, для которых были доступны такие парные образцы (n=14), а также репертуары двух независимых образцов крови одного донора (т.е. биологических повторностей, n=4). Частоты V-сегментов рассчитывали по доле клонотипов с тем или иным V-сегментом от всех клонотипов образца и по доле Т-клеток с тем или иным V-сегментом от всех Т-клеток образца. Для оценки близости распределений частот V-сегментов использовали расстояние Дженсена-Шеннона: чем оно меньше, тем ближе два распределения друг к другу, и, следовательно, тем более похожи сравниваемые репертуары между собой. В результате мы обнаружили, что репертуары Т-клеток образцов ПК и СЖ одного донора более похожи, чем репертуары ПК и СЖ образцов разных доноров (рис. 6А и 6Б). В то же время, репертуары образцов ПК и СЖ одного донора были менее похожи, чем репертуары двух образцов ПК одного донора, при анализе частот V-сегментов, рассчитанных как доля от Т-клеток (рис. 6Б). Данный факт означает, что в репертуаре СЖ каждого пациента есть экспансия клонов с какими-либо V-сегментами, что обуславливает отличие распределения представленности клонотипов с различными V-сегментами

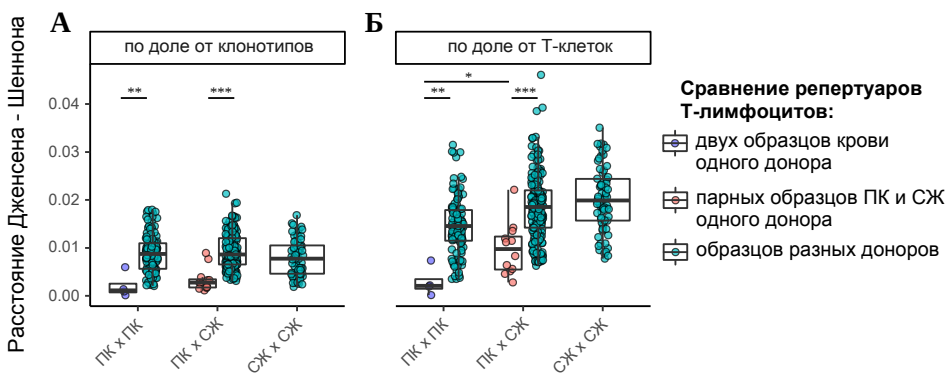


Рисунок 6. Расстояние Дженсена-Шеннона для распределения частот V-сегментов TCR. Проведено сравнение распределений на клональном уровне (А), т.е. доли клонотипов с тем или иным V-сегментом от всех клонотипов, а также на уровне численностей клонов (Б), т.е. доли Т-клеток с тем или иным V-сегментом от всех Т-клеток. Чем меньше расстояние Дженсена-Шеннона, тем ближе распределения друг к другу: для репертуаров, полученных с двух образцов крови одного донора, расстояние минимально. Расстояние между репертуарами ПК и СЖ одного донора значимо больше, чем между репертуарами двух образцов ПК одного донора, что отражает различие в распределении частот V-сегментов в сравниваемых репертуарах. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, U-тест Манна-Уитни.

в СЖ от крови. Таким образом, мы продемонстрировали отличие репертуаров СЖ от крови за счет специфических для сайта воспаления клональных экспансий.

Предполагая, что в очаге воспаления будут общие между пациентами антигены, включая "артритогенный пептид", мы ожидали обнаружить одинаковые клональные экспансии в репертуарах образцов разных доноров. Однако, проанализировав V-сегменты, которые по численности Т-клеток были "обогащены" в СЖ по сравнению с ПК, мы не обнаружили одинаковых между всеми пациентами V-сегментов ни среди репертуара всех Т-лимфоцитов, ни среди репертуаров CD4+ или CD8+ субпопуляций. Данный результат позволяет заключить, что наиболее высокопредставленные клонотипы синовиальной жидкости индивидуальны для каждого пациента.

Поиск клонов с известной специфичностью в репертуарах Т-клеток периферической крови и синовиальной жидкости пациентов с СпА

Согласно гипотезе молекулярной мимикрии, аутореактивные клоны Т-клеток могут изначально быть активированы пептидами вирусного или бактериального происхождения. Однако изучение специфичности всех клонов Т-клеток образца не представляется возможным. В то же время, на сегодняшний день опубликовано множество работ, где установлены последовательности альфа- и/или бета-цепей TCR, специфичных к различным антигенам. Проанализировав нескольких десятков таких публикаций, мы создали базу последовательностей варьируемых доменов TCR с известной специфичностью (к пептидам цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр, вируса гриппа А и др.), что позволяет аннотировать любой реконструированный репертуар Т-лимфоцитов (база VDJdb, <https://vdjdb.cdr3.net/>).

Чтобы выявить присутствие и возможное обогащение сайтов воспаления по сравнению с кровью клонами Т-клеток, специфичными к различным патогенам, мы провели поиск клонотипов из созданной нами базы в репертуарах образцов СЖ и ПК пациентов с СпА (n=12). При этом клонотипы должны были совпадать по аминокислотной последовательности CDR3 и V-сегменту.

В среднем в репертуаре образцов ПК каждого пациента клонотипы с известной специфичностью составляли 0.36% Т-клеток (медиана 0.19%, интерквартильный размах (ИКР) 0.12%-0.27%), что не отличалось от доли, занимаемой такими клонами, в репертуарах здоровых доноров (медиана 0.11%, ИКР 0.11%-0.22%). Значимого преобладания выявленных клонотипов в репертуаре СЖ по сравнению с парным репертуаром ПК того же донора ни по доле от клонального разнообразия, ни по доле от приходящихся на них Т-клеток обнаружено не было.

Таким образом, клоны, предположительно специфичные к пептидам патогенов, присутствуют в сайте воспаления пациентов с СпА. Безусловно, требуются дополнительные исследования, которые подтвердят специфичность выявленных клонотипов к соответствующим антигенам, так как специфичность определяется

структурой варьируемых доменов обеих цепей TCR. В то же время, отсутствие обогащения клонотипов с известной специфичностью в исследованных образцах сайтов воспаления указывает на то, что они не ассоциированы с развитием СпА.

Идентификация клонотипов, обогащенных в очаге воспаления и ассоциированных с АС

Следующим этапом нашего исследования была идентификация потенциально патогенных клонотипов в сайте воспаления пациентов с анкилозирующим спондилитом. Так как ассоциированный с риском развития АС аллель HLA-B*27 является представителем МНС класса I, а значит, презентует пептиды CD8+ Т-клеткам, то мы сфокусировались именно на этой субпопуляции Т-лимфоцитов.

Для каждого из трех HLA-B*27+ пациентов с АС, от которых были получены парные образцы CD8+ Т-клеток ПК и СЖ, мы выделили клонотипы, численность которых в образце СЖ была значимо больше чем в образце ПК ($p < 0.05$, точный тест Фишера, после поправки на множественность по методу Бенджамини-Хохберга). Объединив "обогащенные" клонотипы всех доноров и сгруппировав их на основании сходства аминокислотной последовательности CDR3 TCR, мы отобрали их в виде графа (рис.7).

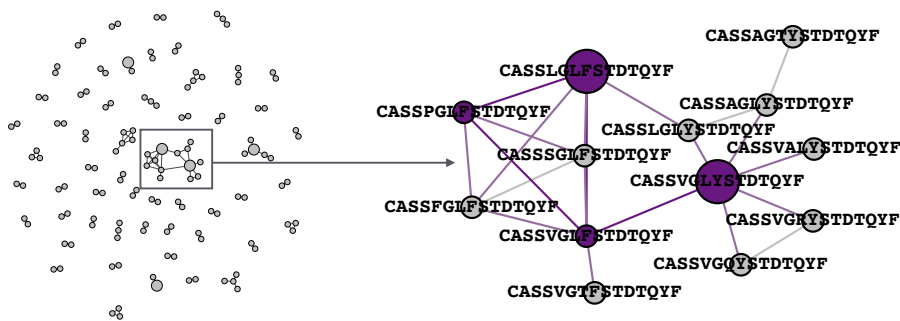


Рисунок 7. Граф клонотипов, обогащенных в образцах CD8+ Т-клеток синовиальной жидкости по сравнению с парными образцами периферической крови пациентов с анкилозирующим спондилитом ($n=3$, $p < 0.05$ точный тест Фишера, после поправки на множественность по методу Бенджамини-Хохберга). Каждый кружок представляет собой аминокислотный клонотип CDR3 TCRbeta. Ребра соединены высокгомологичные клонотипы, чьи последовательности отличаются на 1 аминокислоту. Размер пропорционален количеству доноров, у которых данный клонотип присутствует в репертуаре. Приведены только те клонотипы, для которых существует хотя бы один похожий клонотип, то есть хотя бы одно ребро. Слева прямоугольником выделен наиболее обширный кластер высокгомологичных клонотипов. Справа приведено его увеличенное изображение. Фиолетовым выделены АС-ассоциированные клонотипы, идентифицированные при анализе репертуаров периферической крови пациентов с АС.

Наиболее крупный кластер высокомолекулярных клонотипов был составлен из клонотипов с комбинацией сегментов TRBV9/TRBJ2-3, и 4 из них совпадали с АС-ассоциированными клонотипами, идентифицированными нами ранее в результате анализа репертуаров ПК. Таким образом, мы с использованием двух независимых подходов выделили одну и ту же группу высокомолекулярных клонотипов бета-цепей TCR, что подтверждает их возможную роль в патогенезе АС.

Исследовав репертуары Т-клеток синовиальной жидкости всех пациентов с АС (n=8), мы обнаружили, что АС-ассоциированные клонотипы присутствуют исключительно у HLA-B*27+ пациентов (n=7) и отсутствуют в репертуаре HLA-B*27- пациента. У каждого HLA-B*27+ пациента был выявлен как минимум один из клонотипов. Как и в периферической крови, самым распространенным снова был клонотип TRBV9_CASSVGLYSTDTQYF_TRBJ2-3.

АС-ассоциированные клонотипы не оказались наиболее высокопредставленными в репертуарах СЖ пациентов, составляя 0.18% (медиана 0.06%, ИКР 0.02%-0.30%) от CD8+ Т-клеток, в то время как наиболее высокочисленный клонотип в среднем составлял 7.25% (медиана 5.48%, ИКР 2.74%-7.04%) от этой фракции. Тем не менее, в образцах двух пациентов с недавним началом заболевания (АС, менее 6 мес) наиболее высокочисленный из АС-ассоциированных клонотипов составлял около 0.55% и 0.40% от CD8+ Т-клеток синовиальной жидкости. Можно предположить, что экспансия АС-ассоциированных клонов происходит на начальных этапах патологического процесса.

Присутствие АС-ассоциированных клонотипов в очагах воспаления пациентов с другими спондилоартропатиями

Известно, что клинические признаки между заболеваниями группы СпА пересекаются и один пациент со временем может даже "переходить" из одного заболевания в другое. В качестве примера могут служить ПсА и АС: до 24% пациентов из обобщенной выборки пациентов удовлетворяют критериям обоих заболеваний: CASPAR и модифицированному нью-йоркскому критериям, соответственно. Риск развития ПсА также ассоциирован с аллельной группой HLA-B*27, хотя и не в такой большой степени как АС: по разным данным HLA-B*27 встречается у 20-50% пациентов с ПсА. Сходство клинической картины и генетических ассоциаций АС и ПсА указывают на похожие механизмы патогенеза данных заболеваний. Учитывая вышесказанное, мы проанализировали присутствие идентифицированных АС-ассоциированных клонотипов в репертуарах Т-клеток СЖ и ПК пациентов с ПсА (n=12).

АС-ассоциированные клонотипы были найдены в образцах СЖ всех HLA-B*27+ пациентов с ПсА (n=5) и не были обнаружены ни у одного HLA-B*27-

пациента (n=7), что подтверждает связь выявленных клонотипов с развитием СпА у HLA-B*27+ пациентов. Как и у пациентов с АС, все клонотипы были обнаружены исключительно в образцах CD8+ Т-лимфоцитов и были обогащены в репертуарах Т-клеток СЖ по сравнению с парными репертуарами ПК. Значимых различий в представленности АС-ассоциированных клонотипов между группами пациентов с АС и ПсА обнаружено не было.

Резюмируя, идентифицированные в данной работе предположительно патогенные клонотипы строго ассоциированы с HLA-B*27 и присутствуют у пациентов с различными СпА, что указывает на наличие общих для пациентов (ауто)антигенов и, следовательно, на сходные механизмы патогенеза данных заболеваний.

Определение парной α -цепи АС-ассоциированных клонотипов TCR β

Выявление клонов, характерных для HLA-B*27+ пациентов с СпА, открывает перспективы для изучения процессов инициации и развития данной группы заболеваний. Для определения альфа-цепей АС-ассоциированных клонотипов TCR β мы выделили фракцию CD3+CD8+TRBV9+ клеток, которая обогащена АС-ассоциированными клонотипами, из синовиальной жидкости HLA-B*27+ пациентов с АС и ПсА (n=6). Затем мы провели секвенирование параллельных библиотек альфа- и бета-цепей TCR, полученных с одного препарата клеток фракции, для каждого пациента.

Предполагая одинаковую специфичность АС-ассоциированных клонов, мы ожидали, что альфа-цепи TCR АС-ассоциированных клонов будут одинаковыми или высокоомологичными, а также будут обладать той же представленностью, что и бета-цепи TCR АС-ассоциированных клонов. Сравнив репертуары альфа-цепей выделенных фракций между пациентами, мы не обнаружили общих или высокоомологичных клонотипов альфа-цепей TCR. Тем не менее, мы наблюдали преобладание в репертуарах альфа-цепей CD3+CD8+TRBV9+ фракции клонотипов с TRAV21 у 4 из 6 проанализированных пациентов. Более того, у одного пациента, у которого в репертуаре бета-цепей фракции была обнаружена высокая численность АС-ассоциированного клонотипа TRBV9_CASSVGLYSTDTQYF_TRBJ2-3 (23.7%), в параллельном репертуаре альфа-цепей наблюдалась высокая численность клонотипа TRAV21_CAVSLGTGAGSYQLTF_TRAJ28 (40,6%). Высокая представленность данных клонотипов, а также общая корреляция распределения численности 100 наиболее высокочисленных клонотипов репертуаров альфа- и бета-цепей (коэффициент корреляции $Rho=0.942$, по Спирмену), позволяют предположить, что вышеописанные альфа- и бета-цепь формируют TCR одного клона (рис.8).

Идентифицированная альфа-цепь или схожие с ней по аминокислотной последовательности клонотипы не были обнаружены ни в одном из других

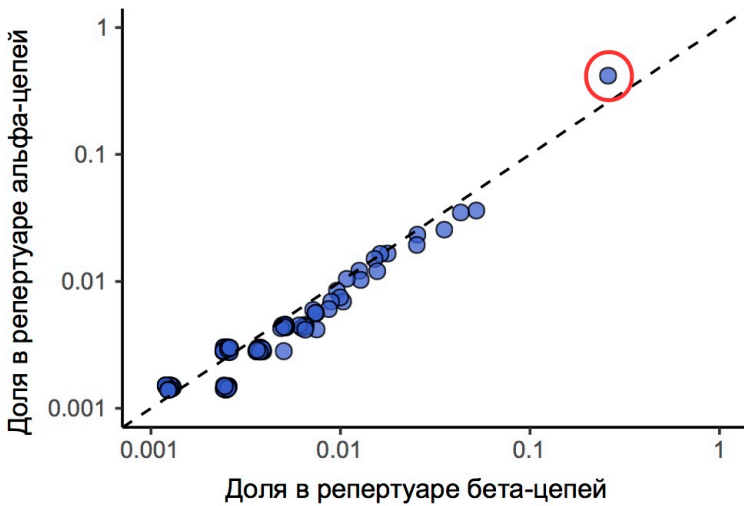


Рисунок 8. Корреляция численностей 100 наиболее высокопредставленных клонотипов в репертуарах альфа (ось Y) и бета (ось X) цепей CD3+CD8+TRBV9+ фракции синовиальной жидкости одного из пациентов. Красным кружком обведен наиболее высокочисленный клонотип альфа- и бета-цепей TCR фракции.

исследованных образцов. По-видимому, TCR α , парные AC-ассоциированным TCR β клонотипам, не обладают высокой гомологией участка CDR3, но скорее всего образованы TRAV21. Такое строение альфа-цепей AC-ассоциированных TCR β позволяет предполагать, что они связываются скорее с молекулой HLA-B*27 и в меньшей степени принимают участие в распознавании антигенного пептида.

Исследование клональных репертуаров Т-лимфоцитов у пациентов с AC после аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток крови

В качестве современной терапии СпА применяют различные препараты, направленные на общее подавление воспалительного процесса или его отдельных компонентов (TNF α , IL-6, IL-17 и др.), однако такая терапия часто оказывается неэффективной или не приводит к долгосрочной ремиссии. Одним из альтернативных подходов для терапии прогрессирующих СпА может стать аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток крови (ТГСК), которая успешно применяется для терапии различных АЗ. При аутологичной ТГСК пациенту сначала проводят химиотерапию для подавления клеток иммунной системы, а затем вводят заранее заготовленные стволовые клетки крови пациента. В результате ожидается, что произойдет "перезагрузка" иммунной системы, которая будет очищена от аутореактивных клонов Т- и/или В-лимфоцитов.

Для исследования терапевтического эффекта ТГСК мы с использованием HTS провели сравнительный анализ различных характеристик Т-клеточного репертуара,

а также отследили динамику полного репертуара и отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови у двух пациентов с АС в течение двух лет после терапевтической аутологичной ТГСК. В рамках использованного протокола трансплантации обогащения трансплантата по CD34+ стволовым клеткам крови не проводилось.

Клональное разнообразие Т-клеточного репертуара оставалось значительно сниженным по сравнению с исходным в течение первого года восстановительного периода у обоих пациентов, продолжая увеличиваться на протяжении всех 2-х лет наблюдения, и у одного пациента достигло нормального значения для данной возрастной группы (рис. 9). Рост разнообразия связан с появлением большого числа низкопредставленных клонотипов, которые не были выявлены в образцах до ТГСК.

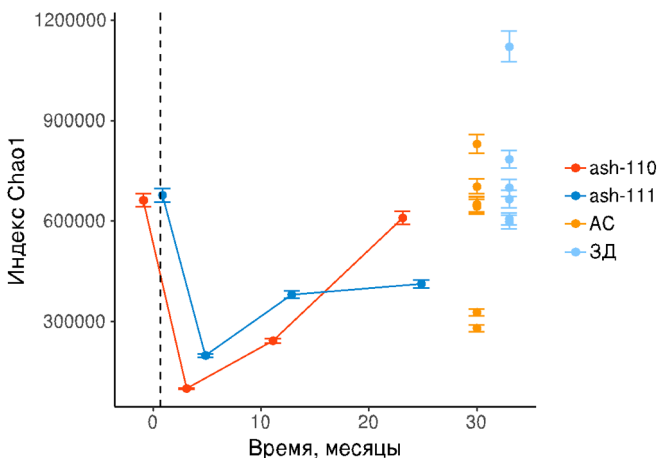


Рисунок 9. Динамика клонального разнообразия Т-клеток периферической крови в течение двух лет после аутологичной ТГСК у двух пациентов с АС (ash-110 и ash-111). Оценка клонального разнообразия TCR β с использованием индекса Chao1. Голубые точки соответствуют здоровым донорам (n=6, возраст 22-34 года, опубликованные данные), оранжевые - пациентам с АС (n=5, возраст 22-34). Вертикальная пунктирная линия отражает момент проведения ТГСК. Для каждого значения отмечен 95% доверительный интервал.

Практически все из 100 клонотипов, наиболее высокопредставленных до ТГСК, обнаружены в репертуаре 2 года спустя и при этом не изменили своей численности независимо от принадлежности к CD8+ или CD4+ субпопуляции Т-лимфоцитов. До 25% Т-клеток периферической крови через 2 года после ТГСК были представлены клонотипами первоначального репертуара. Нам удалось показать, что практически все высокопредставленные и незначительная часть низкопредставленных клонотипов первоначального репертуара пережили аутологичную ТГСК.

Результаты нашей работы существенно расширяют сведения о восстановлении иммунной системы после аутологичной ТГСК и могут быть использованы для оптимизации и разработки новых эффективных протоколов аутологичной ТГСК для терапии тяжелых форм АС.

Заключение

В данной работе мы впервые на глубоком уровне исследовали репертуары Т-лимфоцитов периферической крови и сайтов воспаления у пациентов со спондилоартропатиями. Нам удалось продемонстрировать отсутствие ярко выраженных отличий в общей структуре репертуара Т-клеток периферической крови у пациентов с СпА и здоровых доноров. В то же время, мы идентифицировали группу схожих клонотипов Т-лимфоцитов, ассоциированных с HLA-B*27+ СпА. Распознаваемый ими антиген и их роль в патогенезе заболеваний еще предстоит выяснить. Выявленные клонотипы могут послужить маркерами для дифференциальной диагностики, а также мишенями для направленной терапии HLA-B*27+ СпА.

Наконец, мы исследовали эффект аутологичной ТГСК — одного из возможных подходов к терапии тяжелых форм АС, — в отношении репертуаров Т-клеток в течение двух лет восстановительного периода у пациентов с АС. Мы показали, что примененный протокол трансплантации не привел к реаранжировке или обновлению высокопредставленных клонов репертуара, что обуславливает необходимость исследования других протоколов ТГСК и разработке новых подходов к терапии СпА.

Выводы

1. С применением оригинальной технологии высокопроизводительного секвенирования кДНК генов альфа- и бета-цепей Т-клеточных рецепторов выполнена глубокая реконструкция индивидуальных репертуаров Т-лимфоцитов периферической крови и синовиальной жидкости для репрезентативных выборок пациентов с анкилозирующим спондилитом (АС), псориатическим артритом (ПсА) и здоровых доноров.
2. Продемонстрировано, что общая структура клонального репертуара Т-лимфоцитов периферической крови больных АС значимо не отличается от репертуара здоровых доноров.
3. По результатам сравнительного анализа репертуаров TCR синовиальной жидкости и периферической крови пациентов с АС и ПсА, показано, что репертуары Т-лимфоцитов очага воспаления обладают низким разнообразием и олигоклональны. Наиболее высокопредставленные клоны синовиальной жидкости уникальны для каждого пациента.
4. С применением двух независимых подходов идентифицирована группа

предположительно патогенных клонотипов с высокомолекулярной аминокислотной последовательностью бета-цепей TCR у HLA-B*27+ пациентов с АС.

5. Продемонстрировано присутствие АС-ассоциированных клонотипов в периферической крови и синовиальной жидкости HLA-B*27+, но не HLA-B*27- пациентов с ПсА.
6. Восстановлена полная структура TCR, включающего самый распространенный АС-ассоциированный клонотип бета-цепи:
TRAV21_CAVSLGTGAGSYQLTF_TRAJ28 / TRBV9_CASSVGLYSTDTQYF_TRBJ2-3
7. Продемонстрирована малая степень обновления 100 наиболее представленных клонотипов Т-лимфоцитов в репертуаре через два года после аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток крови у двух пациентов с АС.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. V. I. Nazarov, M. V. Pogorelyy, **E. A. Komech**, I. V. Zvyagin, D. A. Bolotin, M. Shugay, D. M. Chudakov, Y. B. Lebedev, and I. Z. Mamedov. tcR: An R package for T cell receptor repertoire advanced data analysis // BMC Bioinformatics. 2015. Т. 16, № 1, С. 175.
2. M. Shugay, D. V. Bagaev, I. V. Zvyagin, R. M. Vroomans, J. C. Crawford, G. Dolton, **E. A. Komech**, A. L. Sycheva, A. E. Koneva, E. S. Egorov, A. V. Eliseev, E. Van Dyk, P. Dash, M. Attaf, C. Rius, K. Ladell, J. E. McLaren, K. K. Matthews, E. B. Clemens, D. C. Douek, F. Luciani, D. van Baarle, K. Kedzierska, C. Kesmir, P. G. Thomas, D. A. Price, A. K. Sewell, D. M. Chudakov, E. Van Dyk, P. Dash, M. Attaf, C. Rius, K. Ladell, J. E. McLaren, K. K. Matthews, E. B. Clemens, D. C. Douek, F. Luciani, D. van Baarle, K. Kedzierska, C. Kesmir, P. G. Thomas, D. A. Price, A. K. Sewell, and D. M. Chudakov. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity // Nucleic Acids Res. 2018. Т. 46, № D1, С. D419–D427.
3. **E. A. Komech**, M. V Pogorelyy, E. S. Egorov, O. V Britanova, D. V Rebrikov, A. G. Bochkova, E. I. Schmidt, N. A. Shostak, M. Shugay, S. Lukyanov, I. Z. Mamedov, Y. B. Lebedev, D. M. Chudakov, and I. V Zvyagin. CD8+ T cells with characteristic T cell receptor beta motif are detected in blood and expanded in synovial fluid of ankylosing spondylitis patients // Rheumatology (Oxford). 2018. Т. 57. № 6. С. 1097–1104.
4. **E. A. Komech**, Y. B. Lebedev, A. V. Koshenkova, D. S. Syrko, E. A. Musatkina, S. A. Lukyanov, D. M. Chudakov, and I. V. Zvyagin. A study of the repertoire of activated T-cell clones obtained from a patient with ankylosing spondylitis // Bull. RSMU. 2018. Т. 1, № 1. С. 65–73.
5. **E. A. Komech**, I. V. Zvyagin, M. V. Pogorelyy, I. Z. Mamedov, D. A. Fedorenko, and Y. B. Lebedev. Characterization of the T-cell Repertoire after Autologous HSCT in Patients with Ankylosing Spondylitis // Acta Naturae. 2018. Т. 10, № 2. С. 48–57.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Е. А. Кочеч, I. V. Zvyagin, V. I. Nazarov, M. V. Pogorelyy, I. Z. Mamedov, Y. B. Lebedev.** Comprehensive analysis of clonal TCR repertoire in patients with ankylosing spondylitis and HLA-B27+ healthy donors // International Conference on Biomolecular Science in honor of Professor Yuri A. Ovchinnikov – Moscow, 2014. – Acta Naturae. Special issue №1. P.59.
2. **Е. А. Кочеч, I.V. Zvyagin, M.V. Pogorelyy, V.I. Nazarov, A.G. Bochkova, I.Z. Mamedov, Y.B. Lebedev.** Clonal T-cell repertoire analysis of patients with ankylosing spondylitis and HLA-B27+ healthy donors // 4th European Congress of Immunology – 06-09.09.2015 – Vienna, Austria. – Abstract book – P. 119.
3. **Е.А. Кочеч, И.В. Звягин.** Поиск ассоциированных с болезнью Бехтерева клонов TCR с использованием широкомасштабного секвенирования // I междисциплинарная конференция "Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания" – 08-10.12.2016 – Москва. – Научно-практическая ревматология, 2016, Т. 54. прил.3 – С.28.
4. **Е. А. Кочеч, I. V. Zvyagin, E. I. Shmidt, A. A. Klimenko, N. A. Shostak, I. Z. Mamedov, Y. B. Lebedev.** Shared T-cell clones are found in synovial fluid of patients with ankylosing spondylitis // 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference – 03-07.09.2016 – Strbske Pleso, Slovakia. – Abstract book – P. 39.
5. **Кочеч Е.А., Колтакова А.Д., Микелов А.И., Шмидт Е.И., Коротаева Т.В., Лебедев Ю.Б., Звягин И.В.** Поиск характеристических клонов Т-лимфоцитов в синовиальной жидкости пациентов со спондилоартропатиями // II междисциплинарная конференция "Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания" – 11-13.10.2017 – Москва. – Научно-практическая ревматология, 2017, Т. 55. прил.2 – С.15.
6. **Е. А. Кочеч, M.V. Pogorelyy, E.I. Shmidt, A.A. Klimenko, N.A. Shostak, A.G. Bochkova, I.Z. Mamedov, D.M. Chudakov, I.V. Zvyagin, Y.B. Lebedev** // CD8+ T-cells with characteristic TCRbeta motif are found in patients with ankylosing spondylitis” // Cell-Weizmann Institute of Science Symposium: Next Generation Immunology. – 11-14.02.2018 – Rehovot, Israel.
7. **Е. А. Кочеч, А. Miasoutova, A. Koltakova, T. Korotaeva, E. Loginova, E. Shmidt, Y. Lebedev, I. Zvyagin** // TCRbeta CDR3 motif is detected in synovial fluid of patients with different spondyloarthropathies // 43rd FEBS Congress, Biochemistry Forever. – 7-12.07.2018 – Prague, Czech Republic. – FEBS Open Bio, V. 8. S1. – P. 489.
8. **Е.А. Кочеч, А. D. Koltakova, T. V. Korotaeva, E. Y. Loginova, E.I. Shmidt, Y.B. Lebedev, I.V. Zvyagin** // TCR repertoire of activated PD-1+ and CD137+ T-cells from synovial fluid of patients with spondyloarthropathies // 5th European Congress of Immunology – 02-05.09.2018 – Amsterdam, The Netherlands. – Abstract book. P.C1.01.05 – P. 299
9. **Кочеч Е.А., Мясоутова А.А., Колтакова А.Д., Коротаева Т.В., Логинова Е.Ю., Шмидт Е.И., Сальникова М.А., Минервина А.А., Лебедев Ю.Б., Звягин И.В.** // Клональные репертуары Т-лимфоцитов очагов воспаления у пациентов со спондилоартропатиями // III междисциплинарная конференция "Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания" – 16-17.11.2018 – Москва. – Научно-практическая ревматология, 2018, Т. 53, №3. прил.3 – С. 20.